N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A. O. 4061

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THÈSE

DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

par

Monsieur Jean-Michel CAILLAT

pour obtenir

le grade de Docteur-Ingénieur

Sujet de la Thèse : Contribution à l'étude de la lipase du blé : isolement, caractéristiques de son action en milieux aqueux et peu hydraté.

Soutenue le 26 Février 1970 devant la Commission d'Examen :

M. R. ULRICH — *Président*

M. P. MAZLIAK, M. A. GUILBOT — *Examinateurs*

BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
Extrait du Tome 52, n° 1, 1970, p. 59.

Printed in France.

INFLUENCE DES SELS BILIAIRES ET DES IONS CALCIUM SUR L'HYDROLYSE DES TRIGLYCÉRIDES EN ÉMULSION PAR LA LIPASE DE GEMMULE DE BLÉ GERMÉ.

par J. M. Caillat et R. Drapron (*).

Station de Biochimie et Physicochimie des Céréales de l'INRA, au CERDIA, 91 - Massy.

(Mémoire reçu le 3 octobre 1969).

Résumé. — L'influence des sels biliaires et des ions calcium sur l'hydrolyse des triglycérides par la lipase de gemmule de blé germé, a été examinée en utilisant des émulsions d'huile d'olive stabilisées, soit par la gomme arabique, soit par l'alcool polyvinylique.

Les sels biliaires ainsi que les ions alcalino-terreux exercent une action activatrice à faible concentration alors qu'à des concentrations élevées ils se comportent comme inhibiteurs. L'inhibition par les sels biliaires est due vraisemblablement à une diminution de l'aire interfaciale résultant de la rupture de l'émulsion.

Le rôle des ions calcium a été plus particulièrement examiné. Les résultats obtenus montrent que la lipolyse exige la présence de ces ions et que ceux-ci sont sélectivement fixés par l'enzyme dans la phase primaire de la réaction. Un large excès d'ions calcium est nécessaire pour obtenir une lipolyse optimale car, parallèlement à leur rôle de cofacteur, ces ions interviennent pour débarrasser l'interface eau-lipide des acides gras libérés. Une forte concentration, cependant, amène une légère inhibition de la réaction enzymatique due à la rupture partielle de l'émulsion, par suite d'une force ionique trop élevée.

Introduction.

Jusqu'à présent, les recherches entreprises en vue de mieux connaître les caractéristiques des lipases (Glycérol-ester-hydrolases E.C.3.1.1.3) des végétaux supérieurs n'ont pas permis d'aboutir à des résultats aussi fructueux que ceux obtenus dans le cas des lipases d'origine animale ou microbienne. Ceci doit être attribué aux difficultés particulières rencontrées dans l'étude des lipases végétales en raison de leur caractère peu soluble, voire insoluble, et de la quantité, généralement faible, présente dans le matériel examiné [1]. De plus, il est souvent difficile de prendre en

(*) Avec la collaboration technique de M^lle J. Oudot.

considération tous les résultats obtenus, par suite du manque de spécificité des méthodes de mesure d'activité utilisées dans de nombreux travaux.

C'est ainsi que l'essentiel des recherches portant sur l'action d'effecteurs tels que les sels biliaires et les ions calcium a été réalisé avec la lipase de *Candida paralipolytica* et la lipase pancréatique.

En ce qui concerne le mécanisme d'activation de la lipolyse par le calcium en présence de sels biliaires, il a déjà été montré que les ions Ca^{++} servent à débarrasser l'interface des acides gras libérés au cours de l'hydrolyse [2].

En outre, divers auteurs ont été amenés à envisager la fixation spécifique des ions Ca^{++} par l'enzyme et à émettre l'hypothèse suivant laquelle ces ions auraient également pour rôle de compenser la répulsion électrostatique existant entre l'enzyme chargé négativement à pH 9 et les carboxyles ionisés des sels biliaires, au niveau des particules émulsifiées [3, 4, 5].

L'activation de la lipolyse par les sels biliaires a également fait l'objet de nombreuses recherches et plusieurs hypothèses avancées sont fondées sur les propriétés tensio-actives de ces substances. Depuis longtemps en effet, on estime que l'activation serait consécutive à une augmentation de l'aire interfaciale résultant de leur pouvoir dispersant ; de plus, ils permettraient l'adsorption rapide des molécules d'enzyme à l'interface eau-lipide [6], mais la confirmation de cette hypothèse est délicate, d'autant plus que les monoglycérides formés ont aussi de fortes propriétés tensio-actives. D'ailleurs, l'action des sels biliaires ne semble pas limitée à ces seuls effets et on leur a attribué récemment deux fonctions prépondérantes liées à la formation d'agrégats micellaires constitués d'acides gras, de mono-glycérides et de sels biliaires [7, 8] :

— au-dessus d'un seuil de concentration en micelles, les sels biliaires assureraient l'élimination des monoglycérides encombrant la couche interfaciale et inhibant l'action enzymatique par suite de leur configuration spatiale à l'interface ;

— au-dessous de ce seuil, l'hydrolyse des 1-monoglycérides formés par isomérisation des 2-monoglycérides s'effectuerait soit par action directe des sels biliaires sur l'enzyme, soit par modification de l'interface huile-eau.

Les rares observations relatives aux modalités d'action des sels biliaires et des ions Ca^{++} vis-à-vis des lipases végétales, se trouvent dans des travaux réalisés avec des préparations purifiées obtenues à partir du soja [9] et du ricin [10]. Pour la lipase du soja, il a été montré, d'une part, qu'il existe une concentration en sels biliaires pour laquelle la vitesse d'hydrolyse atteint une valeur optimum et, d'autre part, que la présence d'ions Ca^{++} est indispensable à l'action de l'enzyme. Dans le cas du ricin, ces ions se montrent légèrement activateurs pour de faibles concentrations et, au contraire, légèrement inhibiteurs aux concentrations élevées ; de plus, il semble que l'E.D.T.A. n'affecte pas l'activité lipolytique.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Le travail que nous avons effectué a eu pour objet d'étudier l'influence des sels biliaires et des ions alcalino-terreux, tout spécialement les ions Ca^{++}, sur l'activité de la lipase de gemmule de blé germé et de comparer les résultats obtenus avec ceux des travaux relatifs à d'autres lipases.

Techniques.

Préparation purifiée de la lipase de gemmule de blé.

L'un de nous a déjà montré que l'activité lipolytique du blé, très faible dans le grain au repos, augmente considérablement au cours de la germination et se trouve localisée dans la gemmule, tout particulièrement dans le coléoptile [11] ; par ailleurs, la purification, au moins partielle, de l'enzyme a été effectuée [12].

Le protocole opératoire mis en œuvre dans cette étude a notablement été modifié par rapport à celui précédemment décrit par les auteurs ; il comprend la succession d'opérations suivantes :

Des grains de blé (variété Cappelle) sont mis à germer à 30°C, à l'obscurité et sont récoltés lorsque la gemmule atteint une longueur de 5 à 6 cm, l'activité lipolytique présentant alors une valeur optimale. La gemmule est séparée du grain et des radicules, broyée finement en présence de glace carbonique, puis cryodéshydratée.

Toutes les opérations d'extraction et de purification sont réalisées à 0°C. Un gramme de poudre lyophilisée est dispersé dans 40 ml d'une solution de tampon « tris » (*) (pH 10), et maintenu en suspension par agitation pendant 30 minutes. Le liquide obtenu après centrifugation est agité pendant 5 minutes en présence de 1 g de charbon actif. Cette opération permet d'éliminer en grande partie les pigments, tout spécialement ceux provenant de l'action de polyphénol-oxydases, ainsi qu'un certain nombre de protéines, à l'exclusion de la lipase. Ce traitement est suivi d'une centrifugation ; le surnageant clair est traité par une solution de sulfate d'ammonium de façon à amener la concentration en sel à 40 p. 100 de la saturation. Après 30 minutes de contact, le précipité est séparé par centrifugation, repris par 10 ml de tampon tris et la solution obtenue est dialysée contre de l'eau pendant une nuit. En fait, pour certaines expériences, le traitement au sulfate d'ammonium suivi de la dialyse n'a pas été effectué, nous avons vérifié que les résultats obtenus, quant à l'action de nombreux effecteurs (tout particulièrement les sels biliaires et les ions Ca^{++}), n'en sont pas affectés.

Les extraits obtenus présentent, par rapport au produit initial, une activité 10 à 20 fois plus grande et peuvent être conservés deux jours à 0°C, sans perte notable d'activité.

Mesure de l'activité lipolytique.

L'activité lipolytique est déterminée en utilisant un pH-stat enregistreur, par titrage continu à pH 9 des acides gras libérés à 37°C, à partir

(*) Solution aqueuse 0,025 M de trihydroxymethylaminométhane.

d'huile d'olive en émulsion stabilisée, soit par la gomme arabique [13], soit par l'alcool polyvinylique [14]. La validité de cette technique a récemment fait l'objet d'un examen détaillé [15]. La vitesse initiale de la réaction, exprimée en unités lipase (quantité de préparation enzymatique libérant une µ mole d'acide gras par minute) se déduit directement de la pente à l'origine des courbes enregistrées. Par ailleurs, des essais à blanc sont effectués pour tenir compte, d'une part d'une éventuelle autohydrolyse des triglycérides (utilisation d'un mélange réactionnel sans enzyme) et d'autre part, de la libération d'ions H^+ par des systèmes enzymatiques parasites dont les substrats sont quelquefois présents dans les préparations (utilisation d'une émulsion d'huile de paraffine + préparation enzymatique).

Préparation des réactifs.

Substrat. — Après avoir vérifié que l'utilisation des triglycérides purifiés, obtenus par traitement d'huile d'olive à l'acide silicique [15], n'améliore pas l'appréciation des caractéristiques de la lipase étudiée, nous avons utilisé de l'huile d'olive vierge contenant moins de 1 p. 100 d'acides gras libres.

Sels biliaires. — La préparation du mélange de sels biliaires est obtenue par la purification de la bile de bœuf suivant le protocole opératoire décrit par Benzonana et Desnuelle [6]. Cette préparation est utilisée pour les différents essais de lipolyse à partir d'une solution à la concentration de 10 p. 100.

Stabilisateurs d'émulsion.

a) Gomme arabique. — Nous avons utilisé une solution à 10 p. 100 de gomme arabique commerciale débarrassée, par centrifugation, des particules en suspension.

b) Alcool polyvinylique. — Solution à 5 p. 100 de « Rhodoviol » 25/100 M (*).

Effecteurs. — Les solutions d'ions Ca^{++}, Mg^{++}, Sr^{++}, Ba^{++} (sous forme de chlorures) d'une part, d'E.D.T.A. (sel disodique) d'autre part, ont été utilisées à partir de solutions à la concentration de 0,20 M.

Préparation de l'émulsion.

Les émulsions d'huile d'olive stabilisées soit par la gomme arabique, soit par l'alcool polyvinylique, ont été préparées de la façon suivante :

— huile d'olive	35 g
— solution de gomme arabique (ou d'alcool polyvinylique)	200 ml
— glace d'eau déminéralisée	50 g

(*) Produit Rhône-Poulenc.

Le mélange est vigoureusement agité pendant 5 minutes à l'aide d'un broyeur à lames rotatives. L'émulsion stabilisée par la gomme arabique peut être conservée en flacons de 50 ml (hermétiquement bouchés) à 0°C pendant plusieurs semaines et, bien qu'une séparation des plus gros globules lipidiques apparaisse au cours du temps, une agitation manuelle du flacon au moment de l'emploi permet une homogénéisation convenable de l'émulsion sans que l'activité lipolytique en soit affectée. Les émulsions stabilisées par l'alcool polyvinylique sont beaucoup plus stables. Nous n'avons pas mesuré l'aire de l'interface des émulsions utilisées, mais nous avons comparé nos préparations par examen au microscope optique, ce qui nous a permis de distinguer 3 types d'émulsions :

— deux dans la gomme arabique, l'une homogène (taille des globules gras : 5-10 μ), l'autre hétérogène (5-25 μ) ;

— une dans l'alcool polyvinylique (taille du globule gras : 1-2 μ).

Dosage du calcium et du magnésium.

Le dosage du calcium a été effectué par fluorescence X et celui du magnésium par absorption atomique, à partir des cendres de gomme arabique. On trouve respectivement 0,58 et 0,23 p. 100, par rapport à la gomme arabique.

Ces mêmes éléments ont été également dosés, par absorption atomique, dans les préparations enzymatiques non purifiées ; les teneurs moyennes sont tout à fait négligeables vis-à-vis des quantités mises en jeu au cours de nos essais.

Résultats obtenus.

Influence des sels biliaires sur la vitesse de lipolyse.

En utilisant l'émulsion dans la gomme arabique, en présence de chlorure de calcium comme unique activateur, on observe une faible activité lipolytique qui, à partir d'un seuil de concentration en sels biliaires, s'accroît puis passe par un maximum, décroît ensuite et semble tendre vers un palier. (Fig. 1, courbe 1).

En utilisant l'émulsion stabilisée par l'alcool polyvinylique, l'allure du phénomène est sensiblement la même, cependant on observe un optimum d'activité pour une concentration en sels biliaires beaucoup plus faible que dans le cas précédent (Fig. 1, courbe 2). Au-delà de cette concentration on observe une rupture très nette de l'émulsion.

Influence des ions alcalino-terreux sur la vitesse de lipolyse.

Nous avons suivi la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la concentration en ions Ca^{++} avec les deux types d'émulsions stabilisées par la gomme arabique, en présence de sels biliaires à la concentration optimum. Les résultats obtenus son indiqués dans la Fig. 2, courbes 1 et 2. L'activité lipolytique en l'absence d'ions Ca^{++} rajoutés au milieu est très

faible, puis, pour des concentrations croissantes en ions Ca^{++}, la vitesse d'hydrolyse croît linéairement jusqu'à un maximum, et décroît lentement au-delà.

Pour une préparation enzymatique donnée, la vitesse mesurée passe par un maximum d'autant plus élevé que l'émulsion présente une aire interfaciale plus grande.

Avec l'émulsion stabilisée par l'alcool polyvinylique, l'activité lipolytique, nulle en l'absence d'ions Ca^{++}, atteint très vite une valeur maximum et décroît ensuite rapidement pour des concentrations croissantes d'ions Ca^{++} (Fig. 2, courbe 3), à partir desquelles on observe alors une rupture très nette de l'émulsion.

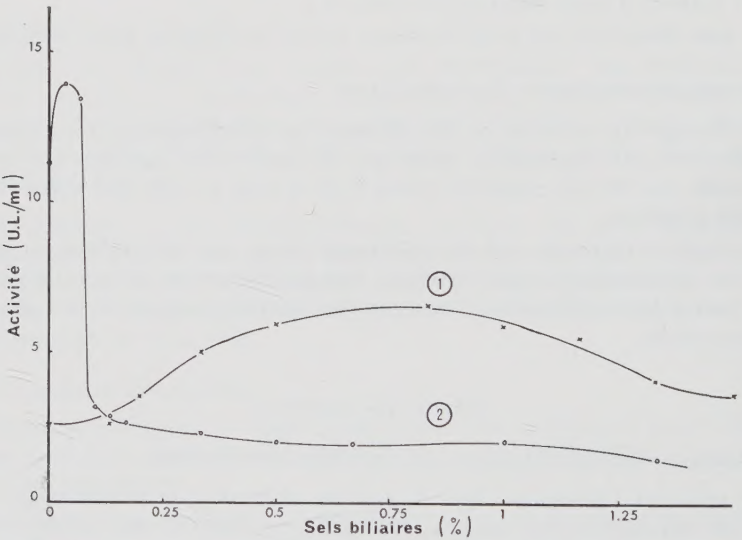

Fig. 1. — Influence de la concentration en sels biliaires sur la vitesse de lipolyse.

Pour chaque essai, à 5 ml d'émulsion, on ajoute 4 ml d'une solution de chlorure de calcium 0,06 M, x ml d'une solution de sels biliaires ; on complète avec de l'eau désionisé à (14,5 — x) ml, le volume final étant de 15 ml après addition de 0,5 ml d'extrait enzymatique.

Courbe 1. — Emulsion stabilisée par la gomme arabique.

Courbe 2. — Emulsion stabilisée par l'alcool polyvinylique.

Si on remplace les ions Ca^{++} par les ions Mg^{++}, Sr^{++}, Ba^{++}, l'allure du phénomène est inchangée. Les résultats indiqués dans le tableau I montrent que ces ions ont un effet activateur voisin ; cependant il semble que l'on puisse les classer par ordre d'influence décroissante : $Mg^{++} > Sr^{++} > Ca^{++} > Ba^{++}$.

Effet de l'E.D.T.A. — Les résultats obtenus avec une émulsion stabilisée par la gomme arabique sont représentés dans la Fig. 3.

En absence de chlorure de calcium dans le mélange réactionnel et pour une concentration de 2,4 mM d'E.D.T.A. rajouté, on observe une inhibition complète de la lipolyse (Fig. 3, courbe 1). La quantité

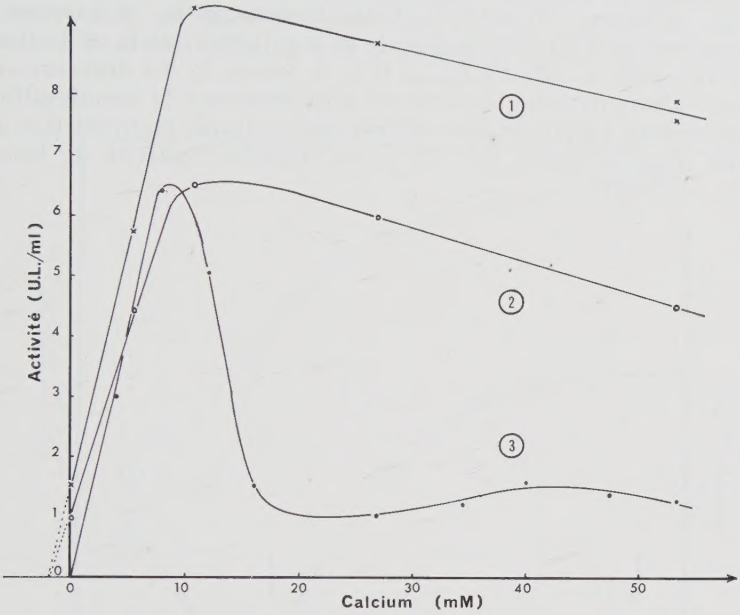

FIG. 2. — Influence de la concentration en ions Ca^{++} sur la vitesse de lipolyse.
Pour chaque essai, les conditions opératoires sont identiques à celles indiquées dans la figure 1, sauf en ce qui concerne la concentration en sels biliaires (x = 0,75 ml) ; seule la concentration en $CaCl_2$ varie.
Courbe 1. — Emulsion « homogène » dans la gomme arabique (taille des globules gras : 5-10 μ).
Courbe 2. — Emulsion « hétérogène » dans la gomme arabique (taille des globules gras : 5-25 μ).
Courbe 3. — Emulsion dans l'alcool polyvinylique (taille des globules gras : 1-2 μ).

TABLEAU I.

Action de divers cations alcalino-terreux sur la vitesse de lipolyse.

Concentration en cation	P. 100 activité			
0	13	13	13	13
4×10^{-3} M	49	63	51	49
8×10^{-3} M	75	97	80	76
$1{,}6 \times 10^{-2}$ M	100	133	110	98
cations	Ca^{++}	Mg^{++}	Sr^{++}	Ba^{++}

L'activité enzymatique est exprimée en pourcentage par rapport à l'essai standard ($1{,}6.10^{-2}$ M en Ca^{++}) effectué dans des conditions identiques. Le milieu réactionnel contient toutefois un peu de calcium et de magnésium apporté par la gomme arabique (cf. texte).

d'E.D.T.A. ainsi déterminée correspond à la complexation de 2,4 mM de calcium, valeur voisine de celle trouvée par microdosage de cet élément dans la gomme arabique.

En présence de chlorure de calcium (concentration correspondant à l'activité optimum = 16 mM), l'activité diminue au fur et à mesure que la concentration d'E.D.T.A. augmente et l'inhibition totale de la lipolyse est obtenue pour 22 mM d'E.D.T.A. (Fig. 3, courbe 2). La différence entre les deux valeurs obtenues correspond sensiblement à la complexation du calcium rajouté. Le phénomène est réversible puisque l'introduction d'une nouvelle quantité d'ions Ca^{++} en excès régénère l'activité de l'enzyme (Fig. 3, courbe 3).

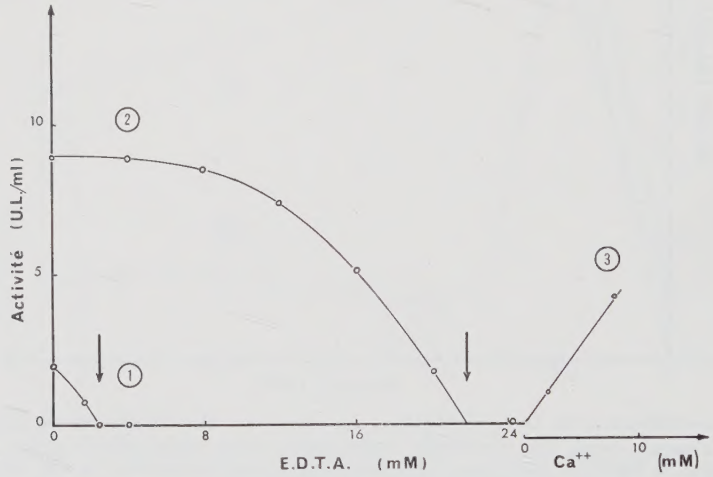

Fig. 3. — Influence de la concentration d'E.D.T.A. sur la vitesse de lipolyse.

Courbe 1. — Inhibition sans Ca^{++} rajouté. Les conditions sont les suivantes : 5 ml d'émulsion stabilisée dans la gomme arabique, 0,75 ml de la solution de sels biliaires, x ml d'une solution d'E.D.T.A., on complète à (14,5 — x) ml avec de l'eau désionisée, et on ajoute 0,5 ml d'extrait enzymatique.

Courbe 2. — Inhibition avec Ca^{++} rajouté. Les conditions opératoires sont les mêmes, on ajoute au milieu réactionnel 4 ml d'une solution de $CaCl_2$ 0,06 M, le volume final étant toujours de 15 ml.

Courbe 3. — Réactivation par un excès de Ca^{++}.

Etude cinétique de la lipolyse.

La quantité de préparation enzymatique mise en jeu étant constante, nous avons suivi l'influence de la concentration du substrat en présence d'une concentration d'ions Ca^{++}, soit fixe (Fig. 4, courbe 1), soit variant proportionnellement à la concentration du substrat (Fig. 4, courbe 2). Dans ce dernier cas, on obtient une courbe sigmoïde et non la courbe de Michaelis habituelle ; toutefois, à partir d'une certaine concentration en substrat, les deux courbes se superposent ce qui tendrait à prouver que la quantité d'enzyme mise en jeu nécessite une quantité de calcium optimale pour manifester une activité maximum.

Afin de préciser cette particularité, nous avons déterminé toutes choses étant égales par ailleurs, l'influence de la « quantité de substrat » (*) sur la lipolyse pour diverses concentrations d'ions Ca^{++} dans le mélange réactionnel. Les courbes de MICHAELIS ainsi obtenues traduisent l'allure du phénomène, et leurs transformations selon LINEWEAVER et BURK donnent des droites (Fig. 5) dont l'extrapolation permet d'obtenir avec

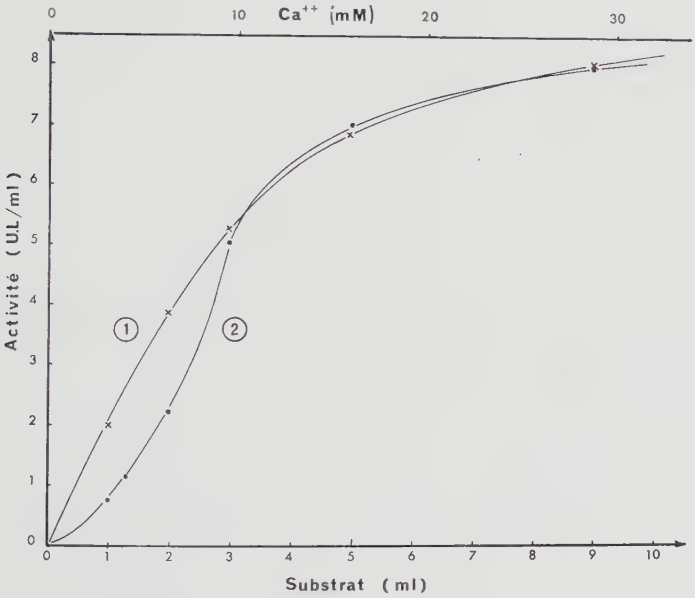

FIG. 4. — Variation de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration de substrat.

Courbe 1. — Le mélange réactionnel est constitué de x ml d'émulsion, 0,75 ml de la solution de sels biliaires, 4 ml d'une solution 0,06 M de $CaCl_2$, on complète à (14,5 — x) ml avec de l'eau désionisée et on ajoute 0,5 ml d'extrait enzymatique.

Courbe 2. — Toutes choses étant égales par ailleurs, la concentration en ions Ca^{++} varie proportionnellement à celle du substrat.

une bonne reproductibilité les valeurs des paramètres cinétiques Vm et Km. La Figure 5 montre que Vm semble indépendant de la concentration d'ions Ca^{++}, alors que Km décroît lorsque la concentration de Ca^{++} croît. Km, exprimé ici en unités arbitraires, a en fait les dimensions d'une concentration d'interface [5].

(*) Il convient de préciser, conformément aux observations de BENZONANA et DESNUELLE [6], que la notion de « concentration » en substrat doit être en fait remplacée par celle de quantité de phase émulsifiée ou même par celle de concentration d'interface ; des quantités croissantes d'une même émulsion pour un même volume total du mélange réactionnel permettront précisément d'obtenir une augmentation de la concentration d'interface.

Discussion.

1. La Fig. 1 montre que les sels biliaires se comportent comme effecteurs de l'hydrolyse par la lipase de gemmule de blé germé, des triglycérides en émulsion : à faible concentration, ils possèdent une action

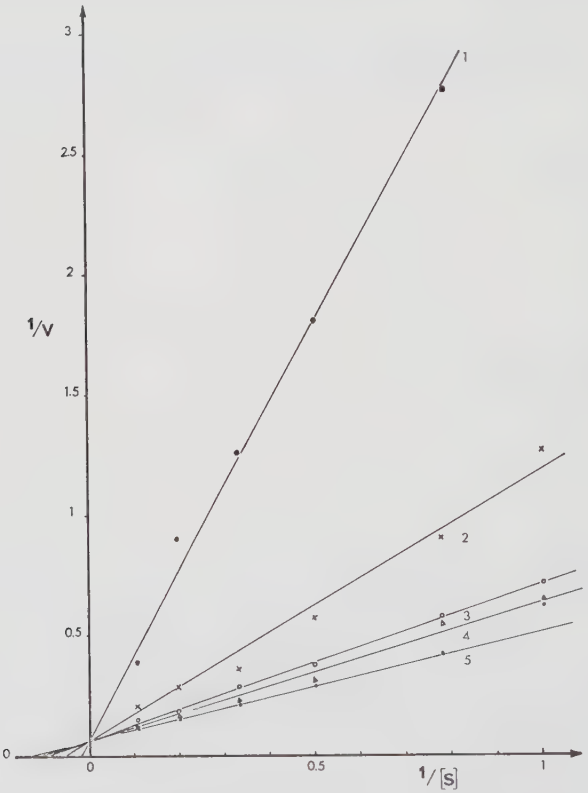

Fig. 5. — Représentation selon Lineweaver et Burk des courbes de Michaelis obtenues pour diverses concentrations en ions Ca^{++}. Les conditions opératoires sont celles décrites pour la courbe 1 de la Fig. 4, sauf en ce qui concerne la concentration en ions Ca^{++}.

Courbe 1. — Sans Ca^{++} rajouté.
Courbe 2. — 4 mM en Ca^{++}.
Courbe 3. — 8 mM en Ca^{++}.
Courbe 4. — 12 mM en Ca^{++}.
Courbe 5. — 16 mM en Ca^{++}.

activatrice alors qu'à des concentrations élevées, ils semblent exercer un rôle inhibiteur, fait qui avait déjà été constaté dans le cas de la lipase du pancréas [16, 17], de l'avoine [18], et du soja [9]. Cette inhibition apparente pourrait être due à une diminution de l'aire interfaciale, résul-

tant de la rupture de l'émulsion, rupture qui est d'ailleurs particulièrement nette dans le cas de l'émulsion à base d'alcool polyvinylique, dès que l'optimum d'activité est dépassé. Par contre, dans le cas de l'émulsion stabilisée par la gomme arabique, la détermination au microscope du diamètre moyen des globules gras du mélange réactionnel, ne permet pas de montrer une diminution appréciable de l'aire interfaciale lorsque l'inhibition est maximum. Du reste, le taux d'inhibition observé dans ce cas est plus faible (46 p. 100) que celui obtenu pour l'émulsion stabilisée par l'alcool polyvinylique (89 p. 100).

La différence de comportement des deux émulsions doit être vraisemblablement attribuée à la nature physico-chimique de l'interface. La stabilité plus grande des émulsions dans la gomme arabique vis-à-vis des sels biliaires pourrait résulter de la présence de charges électriques portées par les groupes carboxyles ionisés des acides uroniques.

De nombreuses expériences restent encore à entreprendre pour mieux comprendre les fonctions apparemment complexes que jouent les sels biliaires au cours de la lipolyse. D'autres types d'action que ceux signalés jusqu'à présent peuvent intervenir ; Terroine [19, 20] a en effet signalé depuis longtemps que leur pouvoir activateur était beaucoup plus important lors d'actions enzymatiques hydrolytiques du suc pancréatique sur des esters solubles, que pour celles s'exerçant sur des triglycérides.

2. Les résultats rassemblés dans le tableau I permettent de penser que la présence d'ions alcalino-terreux est nécessaire à la manifestation de la lipolyse par la lipase de gemmule de blé. De façon à comparer ces résultats avec ceux obtenus dans le cas d'autres lipases, nous avons été amenés à considérer tout particulièrement l'influence des ions Ca^{++}.

a) Tout se passe comme si la présence d'ions Ca^{++} (ou autres alcalino-terreux) était indispensable à la réaction :

α. En l'absence d'ions Ca^{++}, lorsque l'on opère avec une émulsion stabilisée par l'alcool polyvinylique, l'activité lipolytique est nulle.

β. La manifestation d'une faible activité dans le cas d'émulsions stabilisées par la gomme arabique, doit être attribuée à la présence d'une certaine quantité de calcium préexistant dans ce produit. On remarque en effet que les droites représentant le début de l'évolution de l'activité lipolytique en fonction de la concentration en ions Ca^{++}, extrapolées à activité nulle (Fig. 2, courbes 1 et 2), coupent l'axe des concentrations en un même point qui correspond sensiblement à la quantité de calcium présent dans la gomme arabique (0,5 p. 100). Cette valeur est en assez bonne concordance avec celle trouvée expérimentalement (0,58 p. 100) ; cependant, il faudrait également tenir compte de la teneur en magnésium non négligeable de ce produit (0,2 p. 100). La différence entre les valeurs obtenues expérimentalement et par extrapolation, est peut être due, soit à l'imprécision du tracé des courbes d'activation, soit au fait qu'une partie du calcium et du magnésium présents dans la gomme arabique n'est pas disponible pour l'enzyme. La faible activité observée est d'ailleurs annulée par addition d'une quantité d'E.D.T.A. suffisante pour

complexer ces ions. Cet agent complexant respecte l'intégrité de l'enzyme, puisqu'un nouvel excès de Ca^{++} régénère l'activité lipolytique (Fig. 3, courbe 3).

γ. Nous pouvons observer par ailleurs que l'activité lipolytique est d'autant plus élevée que l'aire interfaciale est plus grande, en accord avec les observations de Benzonana et Desnuelle [6]. Cet effet est particulièrement bien marqué pour les émulsions stabilisées par l'alcool polyvinylique. Les activités mesurées (pour les concentrations optima de sels biliaires et d'ions Ca^{++}) en utilisant les émulsions stabilisées, soit par la gomme arabique, soit par l'alcool polyvinylique, sont dans le rapport de 4,2 ce qui correspond au rapport des aires interfaciales des deux émulsions.

b) Tout se passe comme si les ions Ca^{++} (ou autres alcalino-terreux) étaient sélectivement fixés par l'enzyme.

La courbe 2 de la Fig. 4, à partir d'une certaine concentration de substrat (et de calcium pour cette seule courbe), rejoint la courbe de Michaelis obtenue dans le cas où la concentration de calcium demeure constante. Ceci montre que l'on atteint en ce point l'optimum de concentration en calcium nécessaire à la manifestation de l'activité lipolytique maximum. Ainsi, pour une concentration d'interface et une quantité de préparation enzymatique données, l'activité lipolytique ne dépend que de la concentration en ions Ca^{++}.

Ces faits sont confirmés par les représentations classiques de Lineweaver et Burk obtenues pour diverses concentrations en ions Ca^{++}. Nous avons constaté qu'il n'était pas nécessaire d'utiliser des émulsions de triglycérides dans les sels biliaires, comme le préconisent Benzonana et Desnuelle [6], pour obtenir des représentations linéaires à partir desquelles il est possible de calculer les valeurs des paramètres cinétiques Vm et Km (*).

L'examen des droites de la Fig. 5 montre que Vm est pratiquement indépendant de la concentration en ions Ca^{++} alors que Km est inversement proportionnel à sa valeur. Cette observation est en excellent accord avec celles de Ota [3] et Benzonana [5] montrant que les ions Ca^{++} sont sélectivement fixés par l'enzyme dans la phase primaire de la réaction, ce qui confirme les expressions cinétiques des réactions données par ces auteurs :

$$E + co \underset{}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} Eco$$

$$Eco + S \underset{}{\overset{K_2}{\rightleftharpoons}} (EcoS) \xrightarrow{k\ cat.} Produits$$

ou E, co et S désignent respectivement l'enzyme, le cofacteur (**) et le substrat. K_1 et K_2 étant des constantes d'équilibre, k cat. une constante de vitesse.

(*) Nous pouvons remarquer que Vm et Km représentent en fait des paramètres globaux, correspondant au moins à deux réactions successives :

triglycérides ⟶ diglycérides ⟶ monoglycérides.

(**) L'abréviation co désigne le cofacteur, c'est-à-dire les ions Ca^{++} (ou autres alcalino-terreux) nécessaires pour activer le système enzymatique.

Bien que notre expérimentation ait été moins approfondie dans le cas de l'action des autres ions alcalino-terreux, il y a tout lieu de penser que ceux-ci ont un rôle identique. Ota [3] est parvenu aux mêmes conclusions dans le cas de la lipase de *Candida paralipolytica,* sauf en ce qui concerne l'action des ions Sr^{++} ; pour notre part, nous n'avons pas constaté de différence entre l'effet de cet ion et celui des autres alcalino-terreux considérés.

En dehors de ce rôle de cofacteur de l'enzyme, les ions Ca^{++} et les alcalino-terreux de manière générale, interviennent également de façon très importante au cours de la lipolyse *in vitro* en débarrassant l'interface eau-lipide des acides gras libérés par formation de savons insolubles dans l'eau et solubles dans les globules lipidiques. Cette hypothèse a été suggérée par Schonheyder et Volqvartz [21], ainsi que par Desnuelle [22], et démontrée tout récemment par Benzonana et Desnuelle [2] pour la lipase pancréatique. Il semble qu'il en soit de même pour la lipase de gemmule de blé germé ; en effet, le calcul montre que la concentration en ions Ca^{++} nécessaire pour obtenir l'activité maximum est très nettement supérieure à celle nécessaire à la formation des savons de calcium : à 1 p. 100 d'acides gras libérés correspond $1{,}11.10^{-5}$ moles de Ca^{++}, alors que dans les conditions optimales la concentration d'ions Ca^{++} rajoutés est de 24.10^{-5} moles. Une partie étant utilisée pour la formation de complexes enzyme-cofacteur actif, un grand excès est cependant nécessaire pour déplacer efficacement l'équilibre et obtenir une lipolyse optimale. C'est ce que résument les deux équilibres suivants qui interviennent simultanément :

$$\text{Enzyme} + Ca^{++} \rightleftharpoons \text{complexe actif}$$

$$\text{Acides gras} + Ca^{++} \rightleftharpoons \text{sels de calcium insolubles.}$$

La quantité d'ions Ca^{++} fixée par une molécule de lipase ne peut pas être précisée tant qu'une préparation hautement purifiée de l'enzyme n'aura pas été obtenue.

Tableau II.

Influence de la force ionique sur la vitesse de la lipolyse.

Force ionique (μ)	P. 100 activité		
	Ca^{++}		Na^{+}
0	13		13
0,012	49		16
0,024	75		19
0,048	100	$+Na^{+}$	23
0,080	90	90	24
0,120	83	81	22
0,160	75	73	21

L'activité enzymatique est exprimée en pourcentage par rapport à l'essai standard ($\mu = 0{,}048$ en Ca^{++}) effectué dans des conditions identiques.

c) La légère inhibition qui se manifeste aux fortes teneurs en Ca^{++} déjà observée par Ansted et Hansen [17] pourrait être due à une force ionique trop élevée. Nous avons en effet observé qu'au-delà de l'optimum de concentration en Ca^{++}, l'addition, soit de chlorure de calcium, soit de chlorure de sodium, conduit, pour des augmentations équivalentes de la force ionique du mélange réactionnel, à une même diminution de l'activité lipolytique. En outre, nous avons vérifié que les ions Na^{+} par eux-mêmes n'exercent aucune influence sur l'activité (Tableau II). Une force ionique élevée pourrait ainsi amener une rupture partielle de l'émulsion entraînant une diminution de l'aire interfaciale. Il est également possible qu'intervienne un retournement de l'émulsion.

Il semble, en accord avec Ota [4] et Benzonana [5], que l'action des ions Ca^{++} puisse être rapprochée de celle des sels biliaires, leur rôle commun étant de promouvoir les transconformations réciproques de l'enzyme et de son substrat au niveau de l'interface.

Nous remercions M. Guennelon, de la Station d'Agronomie de l'INRA — 84 - Montfavet, qui a effectué le dosage du calcium et du magnesium dans les cendres de gomme arabique.

Summary.

The influence of biliary salts and calcium ions on triglyceride hydrolysis by lipase of germinated wheat gemmule was examined, using olive oil emulsions stabilized either by arabic gum or polyvinylic alcohol.

Divalent cations, biliary salts have an accelerating action at low concentration, whereas they are inhibitors at high concentrations. Inhibition is probably the result of interfacial area decrease caused by a breaking of the emulsion.

The role of calcium ions was especially examined. The results obtained show that lipolysis requires the presence of these ions and that they are selectively fixed by the enzyme in the primary phase of the reaction. A great excess of calcium ions is necessary to obtain an optimal lipolysis because, parralleling their cofactor role, these ions happen to clear released fatty acids from the oil-water interface. Nevertheless, a high concentration leads to slight inhibition of the enzymatic reaction resulting from partial emulsion break as a consequence of too high ionic strength.

Zusammenfassung.

Der Einfluss der Biliairsalze und Ca^{++} Ionen auf die Hydrolyse der Triglyceride durch die Lipase aus jungen Weizenkeimlingen wurde unter Verwendung einer Olivenölemulsion, die entweder mit Gummiarabikum oder mit Polyvinylalkohol stabilisiert wurde, untersucht. Die Gallensäure, wie auch die Ionen der Erdalkalien üben bei niedriger Konzentration eine aktivierende Wirkung aus, während sie sich bei hohen Konzentrationen wie Hemmungsstoffe verhalten.

Die Hemmung durch die Gallensäure hängt wahrscheinlich von einer Verringerung der Zwischenphase ab, die sich aus dem Bruch der Emulsion ergibt.

Die Rolle der Ca^{++} Ionen wurde besonders geprüft. Die erhaltenen Ergebnisse beweisen, dass die Lipolyse bei Anwesenheit dieser Ionen möglich ist, und dass diese Ionen in der primären Reaktionsphase selektiv an dieses Enzym gebunden sind. Ein grosser Uberschuss von Ca^{++} Ionen ist nötig, um eine optimale Lipolyse zu erreichen, weil diese Ionen, parallel zu ihrer Rolle als Cofaktor, die Zwischenphase Wasser-Lipide von den freigewordenen Fettsäuren befreien. Eine

hohe Konzentration verursacht eine leichte Hemmung der enzymatischen Reaktion, die auf einen partiellen Emulsionsbruch infolge zu hoher Ionenstärke zurückzuführen ist.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Drapron, R. et Uzzan, A. — *Ann. Nutr. Alim.*, 1968, **22**, B 393.
2. Benzonana, G. et Desnuelle, P. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **164**, 47.
3. Ota, Y. et Yamada, K. — *Agr. Biol. Chem.*, 1966, **30**, 10, 1030.
4. Ota, Y. et Yamada, K. — *Agr. Biol. Chem.*, 1967, **31**, 7, 809.
5. Benzonana, G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **151**, 137.
6. Benzonana, G. et Desnuelle, P. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, **105**, 121.
7. Borgström, B. — *J. Lipid Research*, 1964, **5**, 522.
8. Mattson, F. H. et Volpenhein, R. A. — *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 1966, **43**, 286.
9. Perl, M. et Diamant, Y. — *Israël J. Chem.*, 1963, **1**, 3a, 192.
10. Ory, R. L., St-Angelo, A. J. et Altschul, A. M. — *J. Lipid Research*, 1960, **1**, 208.
11. Drapron, R., N'Guyen Xuan Anh, Launay, B. et Guilbot, A. — *Cereal Chem.*, sous presse.
12. Drapron, R., Ritzenthaler, G. et Launay, B. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 1966, **263**, 1168.
13. Desnuelle, P., Constantin, M. J. et Baldy, J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, **37**, 285.
14. Laboureur, P. et Labrousse, M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1966, **48**, 747.
15. Vioque, E. et Calderon, M. — *Grasas y aceites*, 1968, **19**, 1.
16. Benzonana, G. — Thèse 3e Cycle, 1962, Fac. Sci. Marseille.
17. Ansted, C. N. et Hansen, I. A. — *Chem. Phys. Lipids*, 1968, **2**, 343.
18. Guilbot, A. — Communication personnelle.
19. Terroine, E. — *C. R. Soc. Biol.*, 1910, **78**, 439-518-638-734.
20. Terroine, E. — Thèse, 1919, Fac. Sci. Paris.
21. Schonheyder, F. et Volqvartz, K. — *Acta Physiol. Scand.*, 1945, **10**, 62.
22. Desnuelle, P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 909.

IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.

Printed in France.